FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Année 1967 THESE N° 30

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

Didier RABINEAU

né le 11 novembre 1939

à CLERMONT (Oise)

Présentée et soutenue publiquement le 1967.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU ROLE DES CELLULES GERMINALES DANS L'ORIENTATION DE LA DIFFERENCIATION GONADIQUE

Président : M. Roger COUJARD, Professeur

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550007_0002

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Année 1967 THESE N°

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

Didier RABINEAU

né le 11 novembre 1939

à CLERMONT (Oise)

Présentée et soutenue publiquement le 1967.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU ROLE DES CELLULES GERMINALES DANS L'ORIENTATION DE LA DIFFERENCIATION GONADIQUE

Président : M. Roger COUJARD, Professeur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Aubin (A.), Bénard (H.), Binet (L.), Bulliard (H.), Cathala (J.), Chabrol (E.), Chailley-Bert (P.), Debré (R.), Fey (B.), Galliard (H.), Gaudart d'Allaines (F. de), Gennes (L. de), Giroud (A.), Halphen (E.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Laroche (G.), Lavier (G.), Lelong (M.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Marchal (G.), Mathieu (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Pasreur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis (D.), Piédelièvre (R.), Quénu (J.), Renard (G.), Richet (C.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Verne (J.).

DOYEN..... Georges BROUET

1er Assesseur..... Daniel BARGETON
2e Assesseur..... Jean GOSSET

1. - PROFESSEURS

1° CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :

Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie et cytologie pathologiques	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	N...
Bactériologie et virologie	TOURNIER (P.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
---	POLONOVSKI (J.)
Biologie appliquée à l'éducation physique et aux sports	MALMEJAC (J.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Biophysique médicale	BUGNARD (L.)
---	DOGNON (A.)
---	DJOURNO (A.)
Cancérologie médicale et sociale	DENOIX (P.)
Chimie pathologique	SCHAPIRA (G.)
Génétique fondamentale	LEJEUNE (J.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie	COURY (Ch.)
Histologie et embryologie	COUJARD (R.)
---	TUCHMANN (H.)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
---	KUSS (R.)
---	VERNE (J.-M.)
Pathologie exotique	N...

Pathologie expérimentale et comparée..... MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale..... LAROCHE (Cl.)
--- ..... BRICAIRE (H.)
--- ..... PEQUIGNOT (H.)
Pathologie respiratoire..... TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales..... N...
Pharmacologie..... CHEYMOL (J.)
--- ..... LEVY (Mlle J.)
Physiologie..... BARGETON (D.)
---..... PARROT (J.)
Physiologie et pathologie obstétricales..... LEPAGE (F.)
Radiologie médicale..... DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale et Chirurgie
expérimentale..... CAUCHOIX (J.)
Thérapeutique..... CONTE (M.)
Thérapeutique appliquée..... LAMOTTE (M.)

b) Professeurs à titre personnel :

Anatomie..... CABROL (Ch.)
Anatomie pathologique..... NEZELOF (Ch.)
Bactériologie..... BARBIER (P.)
Biochimie médicale..... DESGREZ (P.)
--- ..... DREYFUS (J.-Cl.)
Biologie médicale..... BOURLIERE (F.)
Parasitologie..... LARIVIERE (M.)
Pathologie expérimentale..... LOEPER (J.)
--- ..... RICHET (G.)
Physiologie..... DEJOURS (P.)
--- ..... SCHERRER (J.)
Physique médicale..... KELLERSHOHN (L.)
--- ..... GOUGEROT (L.)
--- ..... ROUEAYROL (J.-Cl.)
--- ..... TUBIANA (M.)
Radiologie médicale..... FISCHGOLD (H.)

2° CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires :

Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)..... REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)..... SOULIE (P.)
-- --- (Boucicaut)..... LENEGRE (J.)
Clinique chirurgicale (Beaujon)..... LORTAT-JACOB (J.L.)
--- ..... N...
-- --- (Cauchin)..... LEGER (L.)
-- --- (Hôtel-Dieu)..... PATEL (J.)
-- --- (Saint-Antoine)..... GOSSET (J.)
-- --- (Salpêtrière)..... SICARD (A.)
-- --- (Tenon)..... OLIVIER (Cl.)

Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin)..... MERLE d'AUBIGNE
--- (Foch)..... PADOVANI (P.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)..... FEVRE (M.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)..... DUBOST (Ch.)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laennec)..... MATHEY (J.)
Clinique dermatologique (Saint-Louis)..... DUPERRAT (F.)
Clinique endocrinologique (Pitié)..... DECOURT (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades). LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca)..... HUGUIER (J.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)..... DEGOS (R.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades)..... TURPIN (R.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude Bernard)..... MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte Anne)..... DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)..... HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)..... BERNARD (J.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)..... CASTAIGNE (P.)
Clinique médicale (Bicêtre)..... DEPARIS (M.)
--- (Broussais)..... MILLIEZ (P.)
--- (Cochin)..... BROUET (G.)
--- (Hôtel-Dieu)..... BARIETY (M.)
--- (Lariboisière)..... SEZE (S. de)
--- (Pitié)..... DREYFUS (G.)
--- (Saint-Antoine)..... KOURILSKY (R.)
--- ---- ..... BOUDIN (G.)
Clinique d'hydrologie et de climatologie (Bichat)..... DEBRAY (Ch.)
Clinique médicale infantile et pédiatrie sociale (Enfants-Malades)..... MARIE (J.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)..... JUSTIN-BESANCON
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)..... DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)..... DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)..... GARCIN (R.)
Clinique obstétricale (Baudelocque)..... LACOMME (M.)
--- (Saint-Antoine)..... MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)..... VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)..... OFFRET (G.)
--- (Cochin)..... BREGEAT (P.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière). AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie..... MOZZICONACCI (P.)

Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)..... THIEFFRY (S.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec)..... BERNARD (E.)
Clinique de pneumo-psychiatrie infantile (Salpêtrière)..... MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)..... COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Salpêtrière)..... DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard).. ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine).. LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologie..... GAULTIER (M.)
Clinique traumatologique et orthopédique (R.-Poincaré)..... JUDET (R.)
Clinique urologique (Cochin)..... ABOULKER (P.)
--- (Necker)..... COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)..... LAPLANE (R.)
Séméiologie médicale (A. Chantin)..... DOMART (A.)
--- (Lariboisière)..... BOUVRAIN (Y.)
--- (Pitié)..... RAMBERT (P.)
--- (Rothschild)..... WOLFROMM (R.)
Séméiologie et clinique chirurgicales (Broussais) POILLEUX (F.)

b) Professeurs à titre personnel :

Hématologie..... ANDRE (R.)
--- ..... BOUSSER (J.)
Hydrologie et climatologie..... GIBERTON (A.)
Maladies infectieuses..... BASTIN (R.)
Médecine..... AZERAD (E.)
--- ..... BOUR (H.)
--- ..... GROSSIORD (A.)
--- ..... LAMBLING (A.)
--- ..... LAUNAY (Cl.)
--- ..... PAYET (M.)
--- ..... SIGUIER (F.)
--- ..... WORMS (R.)
Neuro-chirurgie..... LE BEAU (J.)
Neurologie..... LHERMITTE (F.)
Neuro-psychiatrie..... PICHOT (P.)
Oto-rhino-laryngologie..... MADURO (R.)
Pédiatrie..... POLONOVSKI (Cl.)
--- ..... ROYER (P.)
Pneumo-phtisiologie..... KREIS (B.)
--- ..... MEYER (A.)
Rhumatologie..... DELBARRE (F.)

2. - PROFESSEURS SANS CHAIRE

Anatomie pathologique	GOUYGOU (Ch.)
Anesthésiologie	VOURC'H (G.)
Bactériologie	CHRISTOL (D.)
Biochimie médicale	CARTIER (P.)
---	GONNARD (P.)
Biologie médicale	HARTMANN (L.)
Hématologie	BILSKI-PASQUIER
Maladies infectieuses	DUPONT (V.)
Physique médicale	COURSAGET (J.)
---	GREMY (F.)
Physiologie	GIRARD (Fr.)
Stomatologie	CHAPUT (MmeA.)
Thérapeutique	CHASSAGNE (P.)

3. - PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Bactériologie	HAUDUROY (P.)
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.)

4. - PROFESSEUR ASSOCIE

Statistique médicale et épidémiologique	SCHWARTZ (D.)

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Conseillers administratifs	Mlle CHAINTREUIL
	M. FAYE (R.)
Conservateur en chef de la Bibliothéque	
Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine	N. le Docteur HAHN
Conservateurs	Mlles DUMAITRE
	LAURENT
	LE NOIR
Bibliothècaires	Mmes CONTET (J.)
	FORGET (F.)
	Mlles DUROZOY
	ROBERGE
	Dr SCHILLER

Je dédie cette thèse

A MES PARENTS.

En témoignage de mon amour filial.

Par leur générosité et leur affection ils permirent la réalisation de mes études.

Puis-je mériter tout ce qu'il m'ont donné et me montrer digne de leur exemple.

A MON FRERE.

Avec ma profonde affection.

A TOUS LES MIENS.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE.

MONSIEUR le PROFESSEUR ROGER COUJARD
PROFESSEUR d'HISTOLOGIE
à la FACULTE de MEDECINE de PARIS

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Qu'il nous permette d'évoquer le souvenir des cours magistraux qui ont éveillé en nous la vocation de l'histologie,

Qu'il veuille bien accepter l'hommage de notre sincère gratitude et de notre profond respect.

A NOS MAITRES.

MONSIEUR le PROFESSEUR JACQUES LOUVEL
PROFESSEUR D'HISTOLOGIE
à la FACULTE de MEDECINE de ROUEN

Les responsabilités qu'il a bien voulu nous confier nous ont permis de mieux mesurer notre goût pour l'enseignement et la recherche.

Que cette thèse soit le témoignage de notre reconnaissance et de notre respectueux dévouement.

MONSIEUR le PROFESSEUR AGREGE MAROIS
BIOLOGISTE des HOPITAUX
C. H. U. SAINT-ANTOINE

Qui nous honore de sa confiance et nous réserve toujours un accueil bienveillant.

Nous le prions de trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

A NOS MAITRES DE LA FACULTE DE MEDECINE DE PARIS.

A NOS MAITRES DES HOPITAUX DE PARIS.

A NOS MAITRES DE LA FACULTE DE MEDECINE DE ROUEN.

A NOS MAITRES DES HOPITAUX DE ROUEN.

A MONSIEUR le DOCTEUR ANDRE SALESSES

CHEF de TRAVAUX à la FACULTE
BIOLOGISTE - ASSISTANT des HOPITAUX
C. H. U. SAINT-ANTOINE

Dont le dynamisme pondéré et la rigueur scientifique sont pour moi un modèle

Qu'il trouve ici le remerciement aux conseils éclairés qu'il nous a toujours prodigués et le gage de notre amical attachement.

A MONSIEUR le DOCTEUR JACQUES HEMET

CHEF de TRAVAUX à la FACULTE
BIOLOGISTE - ASSISTANT des HOPITAUX
C. H. U. ROUEN

Son esprit d'observation, son éclectisme et sa personnalité ne peuvent qu'inciter ses collaborateurs à partager son enthousiasme

Son aide bienveillante nous fut très précieuse dans la réalisation de nos modestes travaux

Qu'il soit assuré de notre fidèle sympathie.

A MES COLLEGUES ET AU PERSONNEL DES LABORATOIRES D'HISTOLOGIE.

C. H. U. SAINT-ANTOINE

C. H. U. ROUEN

A TOUS MES AMIS

et plus particulièrement

A Monsieur François GERRY

A Monsieur Eivind HANSEN

A Monsieur André KAUFMANN

A Monsieur Jean LEGROS

Dont l'amitié fut un précieux
soutien au cours de mes études.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU ROLE DES CELLULES GERMINALES DANS L'ORIENTATION DE LA DIFFERENCIATION GONADIQUE

INTRODUCTION

Si l'étude des chromosomes permet d'expliquer le déterminisme fondamental du sexe, le dimorphisme sexuel n'apparaît qu'à un stade tardif de l'embryogénèse des mammifères : au moment de la différenciation de la gonade, celle du testicule intervenant plus tôt que celle de l'ovaire (BRAMBELL 11).

Avant cette différenciation, les cordons sexuels de l'ébauche gonadique sont colonisés par les cellules germinales primordiales et les travaux de LIMBORH chez le canard (34) et de MINTZ chez la souris (39) mettent respectivement en lumière une différence sexuelle dans la répartition numérique et la topographie des gonocytes au moment de cet envahissement.

L'étude d'embryons de rat albinos nous permet de constater qu'une différence sexuelle se manifeste déjà à un stade plus précoce : celui de la migration des cellules germinales vers l'ébauche gonadique.

Les modifications morphologiques de la gonade induites par une altération expérimentale de cette migration mettent en évidence la participation déterminante des gonocytes dans l'orientation de la différenciation sexuelle. Cette étude expérimentale fait l'objet de la seconde partie de ce travail.

Ière PARTIE

ETUDE DE LA MIGRATION DES CELLULES GERMINALES EN FONCTION DU SEXE

DONNEES HISTORIQUES.

La première étude concernant les cellules germinales est celle de WALDEYER en 1870 (50) qui mentionne leur présence, dans l'embryon de poulet, au niveau de l'épithélium germinal où il situe leur naissance.

Mais les nombreuses recherches faites depuis vont mettre en lumière la ségrégation précoce des cellules sexuelles et confirmer la théorie de WEISSMANN basée sur l'indépendance du "soma" et du "germen".

Les premières observations en ce sens ont été faites sur les Invertébrés.

BOVERI (9) a montré que dans l'Ascaris, au stade quatre blastomères, trois d'entre eux perdent en se divisant une partie de leur matériel chromosomique. Le quatrième, qui possède des chromosomes plus longs, présente une division sans réduction chromatique. Les trois premiers donnent naissance à des cellules somatiques tandis que le quatrième est à l'origine de la lignée germinale.

Parmi les travaux sur les arthropodes retenons l'exemple du cyclope d'HAECKER : l'un des blastomères initiaux possède des granulations protoplasmiques particulières. Au stade 16 blastomères, il les transmet à deux cellules filles qui deviennent les souches des cellules sexuelles (27).

Chez les insectes il est même possible de mettre

en évidence dans l'oeuf fécondé une zone (plama polaire) qui s'incorporera dans le cytoplasme des cellules germinales initiales (BALBIANI 5). La destruction de cette zone cytoplasmique empêche la formation des gonocytes et les gonades, dérivées des seuls éléments mésodermiques, sont stériles (ABOIM 1).

Pendant longtemps cette ségrégation précoce du "germen" n'était pas admise pour les vertébrés. HARGITT, à la lumière de ses travaux sur les Amphibiens, étudie l'embryon de Rat mâle (28). Il observe des grandes cellules présentant les caractères retenus par d'autres auteurs comme étant ceux des cellules germinales mais, du fait de leur répartition dans l'ensemble de l'embryon, les considère comme des cellules somatiques n'ayant pas effectué leur division et réfute leur spécificité.

SIMKINS, étudiant l'origine des gonocytes et leur migration dans les embryons de souris et de rat (44), trouve les mêmes types de cellules qu'HARGITT. Il interprète ces aspects comme étant ceux de cellules somatiques à différentes périodes de leur métabolisme et de leur mitoses. Il place l'origine des cellules germinales dans une prolifération de l'épithélium germinal débutant au 14e jour du développement. Les conclusions de son travail sur l'embryon humain sont identique (45).

Mais les nombreuses recherches embryologiques vont permettre de mieux reconnaître les cellules germinales et conduire à rejeter leur origine aux stades les plus précoces du développement. Ainsi, l'exception

des Vertébrés devient progressivement un exemple confirmant les notions acquises sur les Invertébrés.

Nous allons voir, en étudiant l'embryologie comparée, que l'origine des gonocytes a été reculée peu à peu jusqu'à l'entoderme et même dans les cellules du pôle inférieur de l'oeuf au stade gastrula, c'est-à-dire au voisinage des futures cellules entodermiques.

Etudiant la Lamproie, WHEELER (51) situe l'origine initiale des cellules sexuelles dans de grandes cellules claires qui sont enfermées par les éléments mésodermiques au moment où ils se séparent de l'entoderme. Elles gagnent ensuite l'aire de la gonade définitive par une translation vers la région médiane. Ultérieurement, par division, elles donnent naissance aux cellules sexuelles définitives. OKKELBERG (42)

Chez les poissons HENNEGUY (29), ALLEN (3) reconnaissent aux cellules germinales une origine entodermique. Ce sont des cellules de grandes tailles, chargées d'enclaves vitellines. Elles migrent ensuite dans la racine du mésentère où elles forment une ébauche impaire qui se divise ultérieurement en deux pour envahir les ébauches génitales mésodermiques.

Les résultats des observations faites chez les Batraciens sont assez comparables : ALLEN (2), DUSTIN (18). De grandes cellules, riches en pigments ou en enclaves vitellines, situées d'abord à l'origine de l'entoderme, migrent en une ébauche impaire et médiane. Cette dernière se transforme ensuite en une ébauche paire par translation. Les expériences d'HUMPHREY (31) apportent la preuve de leur appartenance à la lignée germinale et de leur spécificité dans l'origine des cellules sexuelles difinitives.

Dans ses travaux sur la grenouille BOUNOURE (8) met en évidence une région du pôle inférieur de l'oeuf où est situé le déterminant sexuel avant le début de la segmentation . Son irradiation permet d'obtenir des embryons dépourvus de gonocytes (9) ce qui n'est pas sans rappeler les constatations faites initialement sur les invertébrés.

Dans le travail de SWIFT (48) sur l'embryon de poulet apparaît pour la première fois la description de l'origine extra-embryonnaire des gonocytes elle se situe au niveau d'une zone en croissant à l'union de l'aire transparente (bien visible chez les oiseaux) et de la crête germinale, c'est-à-dire entre ectoderme et entoderme. Secondairement, les gonocytes sont retrouvés dans le mésoderme qui se développe dans cette région et gagnent les vaisseaux. Leur migration les conduit ensuite dans la racine du mésentère, dans la région moyenne et postérieure du mésoderme splanchnique et dans l'épithélium coelomique au niveau où se forme l'ébauche gonadique.

Les expériences d'irradiation (BENOIT 6) ou de destruction au thermocautère (DANTCHAKOFF 16) de la zone décrite par SWIFT ont abouti à la formation de gonades stériles ; elles confirment l'origine et la ségrégation précoce des cellules germinales.

Chez les mammifères les recherches vont progressivement permettre des conclusions identiques.

Des travaux de BRAMBELL sur l'ébauche gonadique et l'ovaire de la souris (11) il faut retenir une observation importante ; il constate la présence de cellules germinales typiques dans le mésentère intestinal à proximité de l'éminence génitale et précise que cette

dernière apparaît au 9e jour le long de la face ventrale du corps de Wolff.

FIRKET (21) constate la présence de cellules germinales dans le mésenchyme de la splanchnopleure et la racine du mésentère avant la formation de l'éminence génitale ; il pense que le plus grand nombre de ces cellules dégénèrent. Quelques unes d'entre elles migrent et sont enfermées par les cordons sexuels mais la majorité des cellules sexuelles définitives naît des éléments épithéliaux de la gonade. Il distingue ainsi au niveau des cordons sexuels de la gonade de Rat albinos deux types de cellules germinales : il réserve aux premières, caractérisées par leur grande taille, le terme de cellules germinales primordiales et donne aux secondes, plus petites, le nom de cellules épithéliales germinatives ; seules ces dernières seraient à l'origine des cellules sexuelles définitives.

Mais la différenciation précoce et indépendante des gonocytes ainsi que l'exclusivité de la filiation cellules germinales primordiales - cellules sexuelles définitives va être démontrée par des études expérimentales.

Dès 1926, ANCEL et BOUIN (4) constatent qu'après destruction des grandes cellules germinales par les rayons X au niveau des ébauches génitales du Cobaye, les petites cellules restantes (sertoliennes) ne peuvent donner naissance à des spermatogonies.

Les observations d'EVRETT (19) à propos des transplantations, chez la souris, de l'éminence génitale au niveau du rein apportent une confirmation : si l'ébauche est transplantée après son peuplement par les gonocytes elle donne naissance à un testicule où à un

ovaire ; au contraire, si la transplantation est faite avant l'arrivée des gonocytes il n'y a pas de formation de cellules sexuelles bien que la différenciation des canaux mésonéphrotiques soit normale.

Toujours chez la souris, CHIQUOINE (12) dans un travail plus récent, précise l'origine précoce des cellules germinales : elles apparaissent au 8e jour dans la partie caudale de la ligne primitive, la racine de l'allantoïde et la splanchnopleure de la vésicule ombilicale. Elles migrent dans l'intestin postérieur et le mésentère pour gagner l'aire de l'ébauche génitale. L'auteur souligne l'absence de cellules germinales dans les vaisseaux. Cette notion, confirmée ultérieurement par MINTZ et RUSSEL (38) s'oppose aux observations faites sur l'embryon de poulet par WILLIER (52) vérifiées expérimentalement par D. SIMON (46).

L'origine et la migration des cellules germinales a été étudié récemment par JOST et PEPIN (32) dans l'embryon de veau à propos des free-martin. Le schéma général est identique à celui constaté dans l'embryon de souris. Remarquons que les auteurs notent la présence de gonocytes dans l'appareil circulatoire mais insistent sur leur petit nombre et sur l'absence de certitude quant à leur destinée gonadique.

Les travaux sur l'embryon humain sont, bien entendu, beaucoup moins nombreux. Ils permettent, néanmoins, d'évoquer une certaine similitude avec les observations faites sur les autres mammifères.

DEBEYRE et CHRISTIN (17) à propos d'un embryon humain de 31 - 32 somites (4,5 mm) envisagent pour les

gonocytes des destinées variables au moment de leur parcours de l'allantoïde à l'éminence génitale : les uns s'arrêtent en chemin, certains dégénèrent, d'autres se mettent à "l'unisson" des éléments épithéliaux coelomiques, "d'autres enfin, lors de leur passage dans le mésenchyme, ou le mésoblaste, communiquent peut-être à certains éléments cellulaires une induction suceptible de les modifier provisoirement et aux cellules épithéliales coelomiques, en particulier, une induction capable de conférer à quelques-unes d'entre elles toutes les potentialités reproductrices".

La description des gonocytes à un stade plus précoce apparaît dans l'étude de CORDIER et COUJARD (13) d'embryons de 0,90 mm et de 1,05 mm. Les cellules germinales sont situées, dans les deux cas, d'une part dans l'ébauche entodermique de l'allantoïde et le mésenchyme immédiatement contigu ; d'autre part dans la partie postérieure de la vésicule ombilicale, à distance de l'ébauche allantoïdienne.

Dans un travail très complet WITSCHI (53) étudie trente trois embryons humains de 13 somites à 8 mm. Il situe l'origine des gonocytes dans l'entoderme de la vésicule ombilicale près de la naissance de l'allantoïde. De là ils migreraient dans l'intestin postérieur puis dans le mésenchyme et, à travers le mésentère, gagneraient l'aire mésonéphrotique. L'absence de voies matérialisées pour cette migration fait conclure l'auteur à la secrétion par les gonocytes d'une substance lytique qui leur permettrait de se frayer un chemin dans les tissus.

En définitive, nous retiendrons l'origine entoblastique des cellules germinales primordiales et leur

migration dominante dans la splanchnopleure de la vésicule ombilicale et le mésentère vers l'ébauche gonadique.

Ainsi se trouvent réunis les trois éléments qui participent à la formation de la gonade :

- l'ébauche mésodermique qui donne lieu à la formation de l'épithélium germinatif et des cordons.

- les gonocytes qui viennent peupler les cordons et déterminent la fertilité de la gonade.

- les éléments mésonéphrotiques à l'origine des canaux vecteurs qui vont relier la gonade à l'ensemble de l'appareil génital.

MATERIEL ET METHODE

Notre étude porte sur 15 embryons de rat Wister au moment de la migration des gonocytes ;

- 6 embryons sont au 10e jour de la gestation
- 9 embryons sont au 12e jour de la gestation.

L'âge embryonnaire est établi par la méthode des frottis vaginaux, la présence de spermatozoïdes indiquant le premier jour de la gestation.

Les embryons sont prélevés avec les cornes utérines. Celles-ci, orientées selon l'axe du méso-utérin sont fixées puis incluses dans la paraffine. Les coupes, épaisses de 8 microns, sont faites en série perpendiculairement à l'axe du méso.

La mise en évidence des gonocytes n'a pas été basée sur leurs caractères morphologiques (grande taille, noyaux volumineux, zone de Golgi bien visible, aspect des mitochondries) souvent discutables (SIMKINS, EVRETT) mais sur leurs propriétés enzymatiques. Ils présentent, en effet, une réaction phosphatase alcaline positive observée la première fois par Mac KAY (37) sur l'embryon humain en 1953. Nous avons repris cette réaction histochimique selon la technique de GOMORI (26) déjà utilisée avec succès pour l'étude des cellules germinales de la souris (CHIQUOINE, MINTZ et RUSSEL). Cette méthode donne aux gonocytes une coloration noire intense permettant de les distinguer nettement des cellules voisines si le passage dans le glycérophosphate est bref (un bain trop prolongé fait apparaître une réaction positive au niveau de presque toutes les cellules).

Compte tenu de cette réserve la coloration est suffisamment élective (photo 1) pour mettre le comptage et l'étude topographique des cellules germinales sur chaque coupe. La position des gonocytes a été déterminée par rapport à l'intestin postérieur, au mésentère et à la zone de l'ébauche génitale. L'orientation des coupes et la croissance globale des embryons ont été étudiées sur deux embryons de chaque sexe au 12e jour de la gestation par des reconstructions en cire selon la méthode de BORN. Nous avons reconstruit avec un grossissement 200 le tube neural et le tube digestif ; les gonocytes ont été représentés selon leur situation topographique (photo 3 et 4).

La détermination du sexe a été basée sur l'étude de la chromatine sexuelle. Son identification sur les tissu embryonnaires présente certaines difficultés en raison de l'importance des mottes chromatiniennes et de la densité du matériel nucléaire. Cependant, en étudiant un tissu lâche dont les cellules gardent une chromatine finement dessinée, comme celui de l'ébauche cardiaque, les corps de Barr sont bien visibles (photo 2); la coloration nucléaire employée est celle de Unna au Vert de méthyle-pyronine après hydrolyse par l'acide chlorhydrique normal.

PHOTO 1

Coloration noire des gonocytes
(phosphatases alcalines)

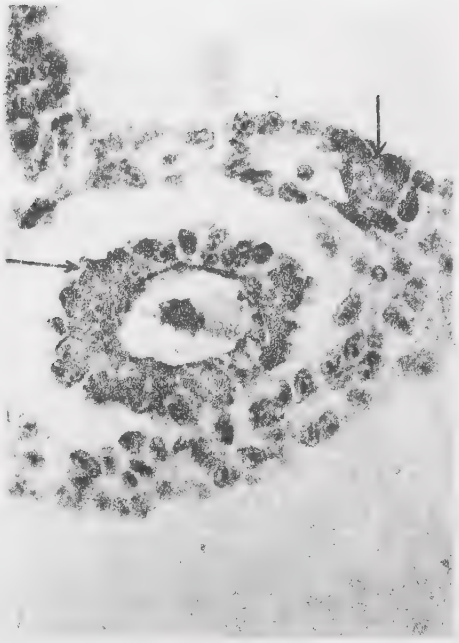


PHOTO 2

Corpuscule chromatinien dans
les noyaux de l'ébauche cardiaque

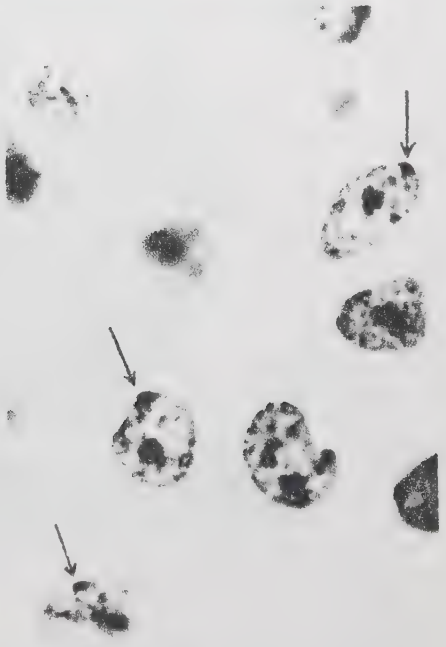


PHOTO 3

Embryon femelle

PHOTO 4

Embryon mâle

Reconstruction en cire du tube neural et du tube digestif au 12e jour.

RESULTATS

1 - Mise en évidence du sexe chromatinien

L'étude de la chromatine nucléaire nous a permis de mettre en évidence, dans les cellules de certains embryons, une masse chromatinienne nettement individualisée par :

- sa coloration dense
- sa taille avoisinant le micron
- sa situation périphérique

Ces caractères sont ceux d'un corps de Barr.

Ce corpuscule chromatinien apparaît, pour une première catégorie d'embryons, dans 90% des cellules. Pour les embryons restants, il n'existe que dans 20 à 30% des cellules. Nous considérons que cette différence est significative et que l'existence d'un corps de Barr dans 90% des cellules est en faveur du sexe femelle de l'embryon.

Nous avons ainsi reconnu

- trois embryons femelles du 10e jour (F1 à F3)
- cinq embryons femelles du 12e jour (F4 à F8)

Par élimination il nous reste

- trois embryons mâles du 10e jour (M1 à M3)
- quatre embryons mâles du 12e jour (M4 à M7)

2 - Position des embryons dans la corne utérine

Les embryons présentent tous une situation

identique dans la corne utérine. Nos constatations, à ce sujet, sont différentes de celles de SNELL (47).

Du 10e jour à la naissance l'embryon occupe une position telle que sa face dorsale est située à l'opposé du méso-utérin. Son axe dorso-ventral est parallèle au plan du méso. (schéma A)

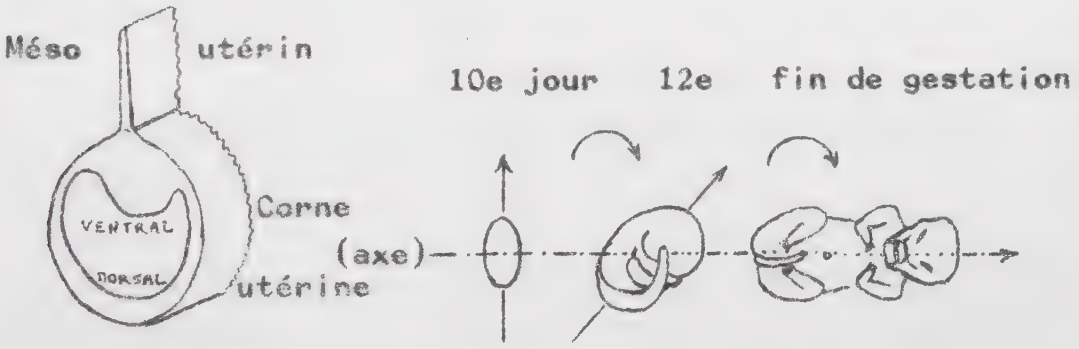


Schéma A Schéma B

En outre nous avons observé que l'embryon présente une rotation progressive de telle sorte que sa position varie par rapport à l'axe de la corne utérine. Au 10e jour le grand axe de l'embryon est perpendiculaire à celui de la corne utérine ; au 12e jour, ces deux axes font entre eux un angle de 45° ; en fin de gestation ils se confondent (schéma B).

3 - Orientation des coupes

Nos observations sur la position des embryons dans la corne utérine expliquent comment l'orientation des coupes, faites en série sur une corne entière, est

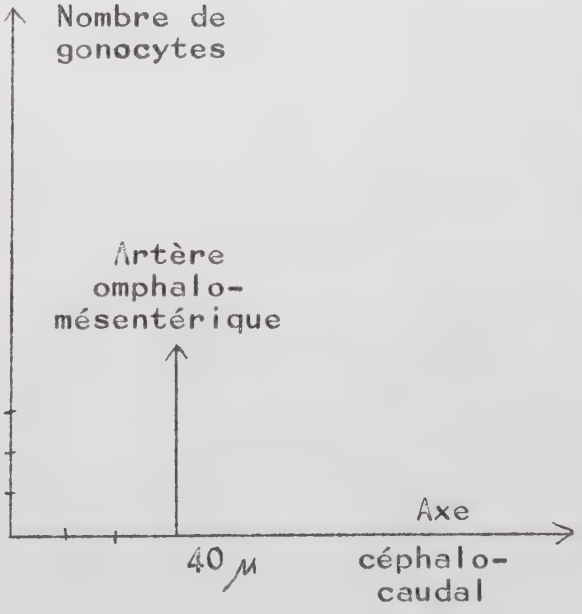
la même pour tous les embryons. Compte tenu de la courbure des embryons les coupes s'étendent selon l'axe céphalo-caudal dans la partie moyenne alors qu'elles deviennent transversales au niveau des extrémités en particulier dans la région caudale où sont retrouvés les gonocytes.

Nous avons contrôlé ces résultats en étudiant les reconstructions en cire.

4 - Représentation schématique de la répartition des cellules germinales

Ayant constaté que la région caudale était coupée transversalement nous avons établi une méthode simple pour transcrire en diagramme la topographie et le nombre des gonocytes.

L'axe des abcisses représente l'axe céphalo-caudal : nous marquons un repère correspondant à la naissance de l'artère omphalo-mésentérique puis chaque division correspond à un éloignement de 40 microns par rapport à cette artère (5 coupes).



Le nombre des gonocytes est indiqué en ordonnées en groupant les résultats du comptage pour 5 coupes successives.

Le diagramme ainsi obtenu est fait de rectangles successifs dont la surface est proportionnelle au nombre des gonocytes et dont la position précise leur situation topographique le long de l'axe céphalo-caudal.

5 - Nombre et situation des gonocytes

Au 10e jour de la gestation toutes les cellules germinales sont situées dans l'intestin postérieur et le mésentère voisin.

Leur position est identique dans les deux sexes mais leur nombre est plus grand dans les embryons mâles que dans les embryons femelles.

Nous avons compté :

- 123 gonocytes en moyenne dans les mâles
- 91 gonocytes en moyenne dans les femelles

Un diagramme résume ces résultats pour chaque embryon (schéma 1 et 2).

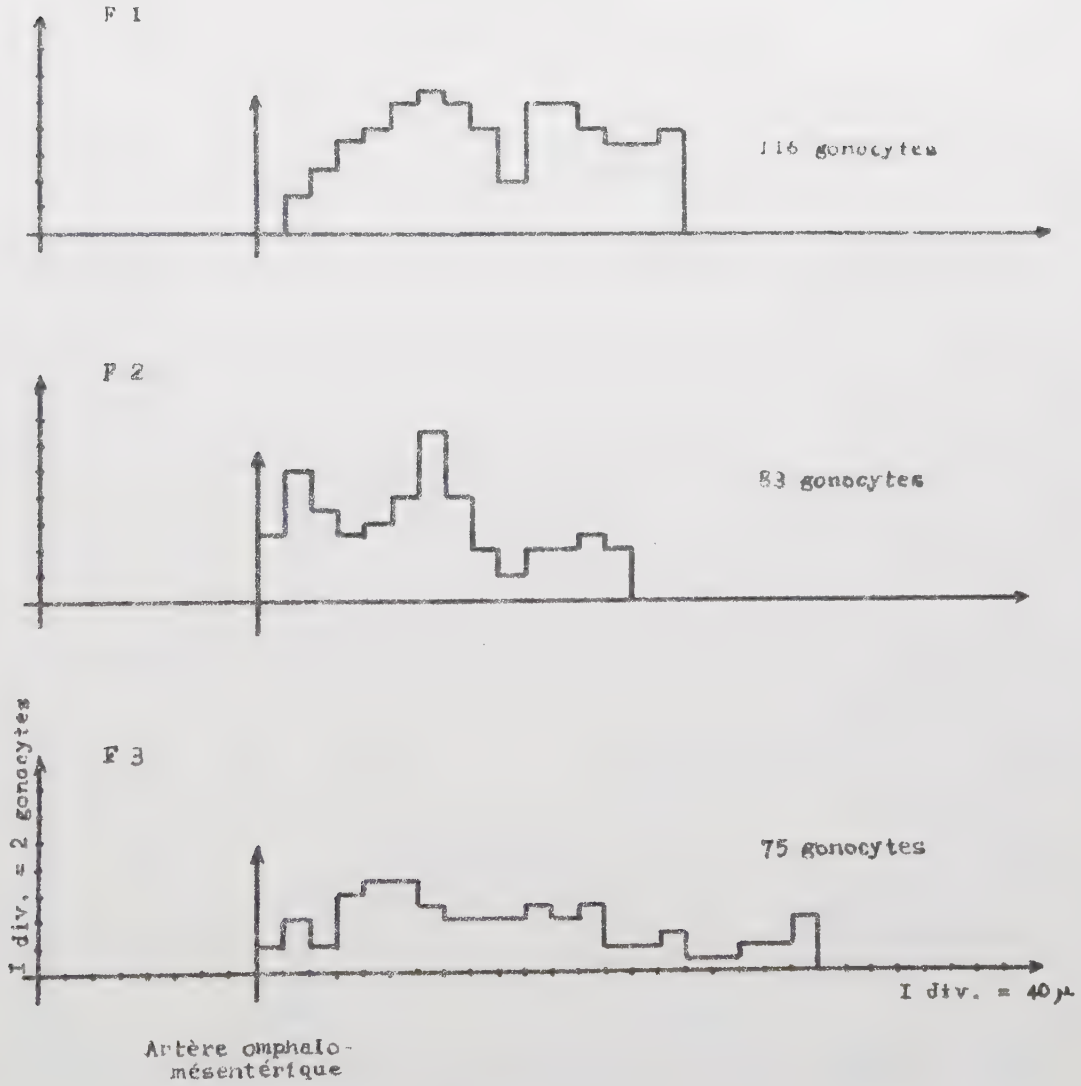
Au 12e jour nous constatons que les gonocytes sont répartis en deux groupes :

- Les uns sont situés dans la région de l'ébauche gonadique et l'épithélium coelomique sous jacent, nous les appelerons indistinctement "gonocytes gonadiques".

- Les autres sont encore situés dans la paroi de l'intestin postérieur et le mésentère voisin, comme dans les embryons du 10e jour, nous les avons regroupés sous le terme de "gonocytes extra-gonadiques".

EMBRYONS FEMELLES

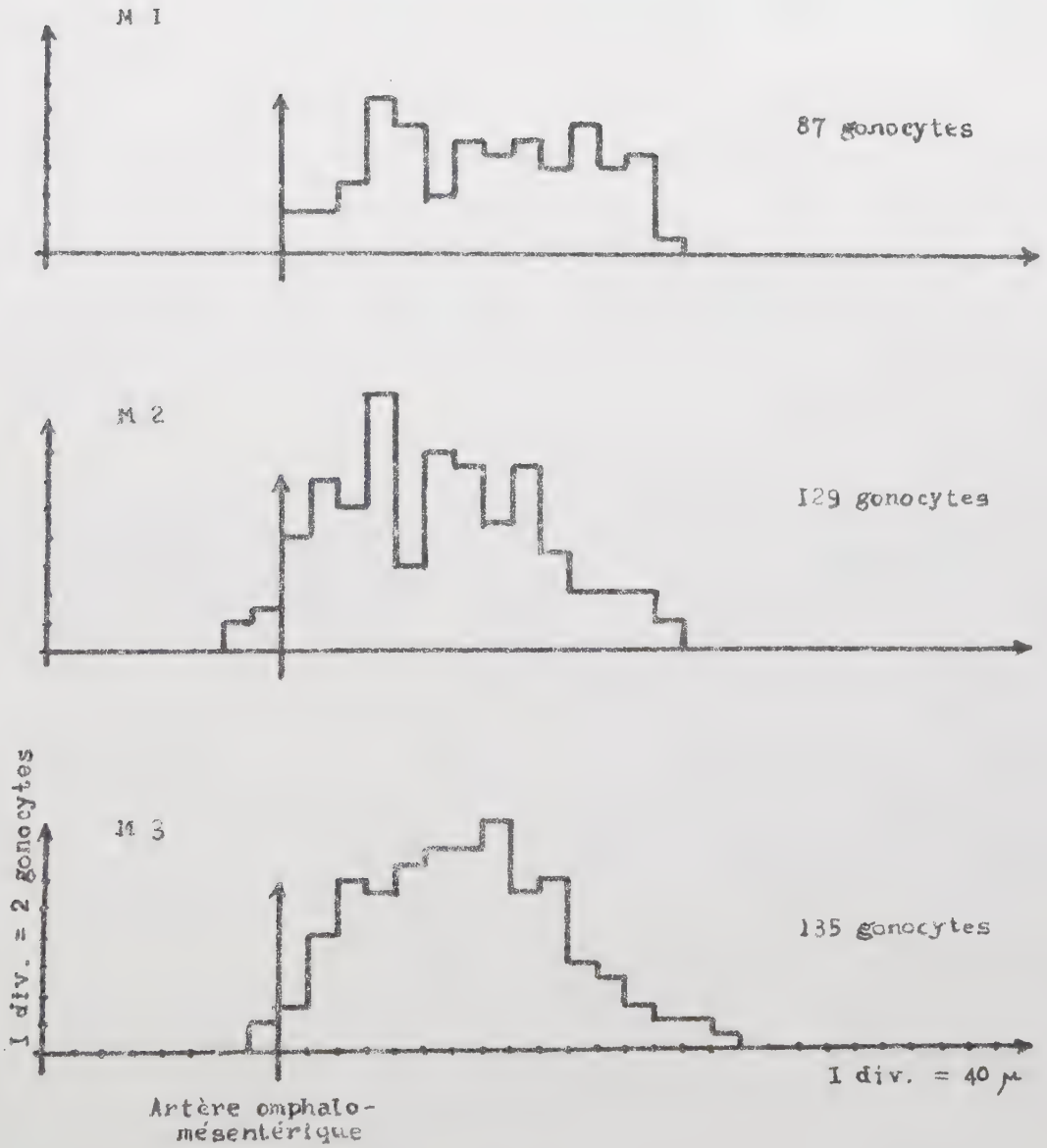
IOe jour



SCHEMA I.

EMBRYONS MALES

10e. jour



SCHEMA 2.

Le nombre total des gonocytes est sensiblement identique dans les deux sexes : 239 en moyenne dans les embryons femelles contre 249 dans les embryons mâles.

Par contre, leur répartition varie selon le sexe : nous avons observé que :

- 29% seulement des gonocytes sont encore extra-gonadiques dans les embryons mâles contre 43% dans les embryons femelles,

- ou encore, que si 71% des gonocytes sont situés dans l'ébauche gonadique des embryons mâles, 57% seulement ont atteint cette région dans les embryons femelles.

Les résultats détaillés pour chaque embryon ont été résumés dans les tableaux 1 et 2 et représentés sous forme de diagramme (schéma 3 et 4).

TABLEAU 1 - EMBRYONS FEMELLES du 12e jour.

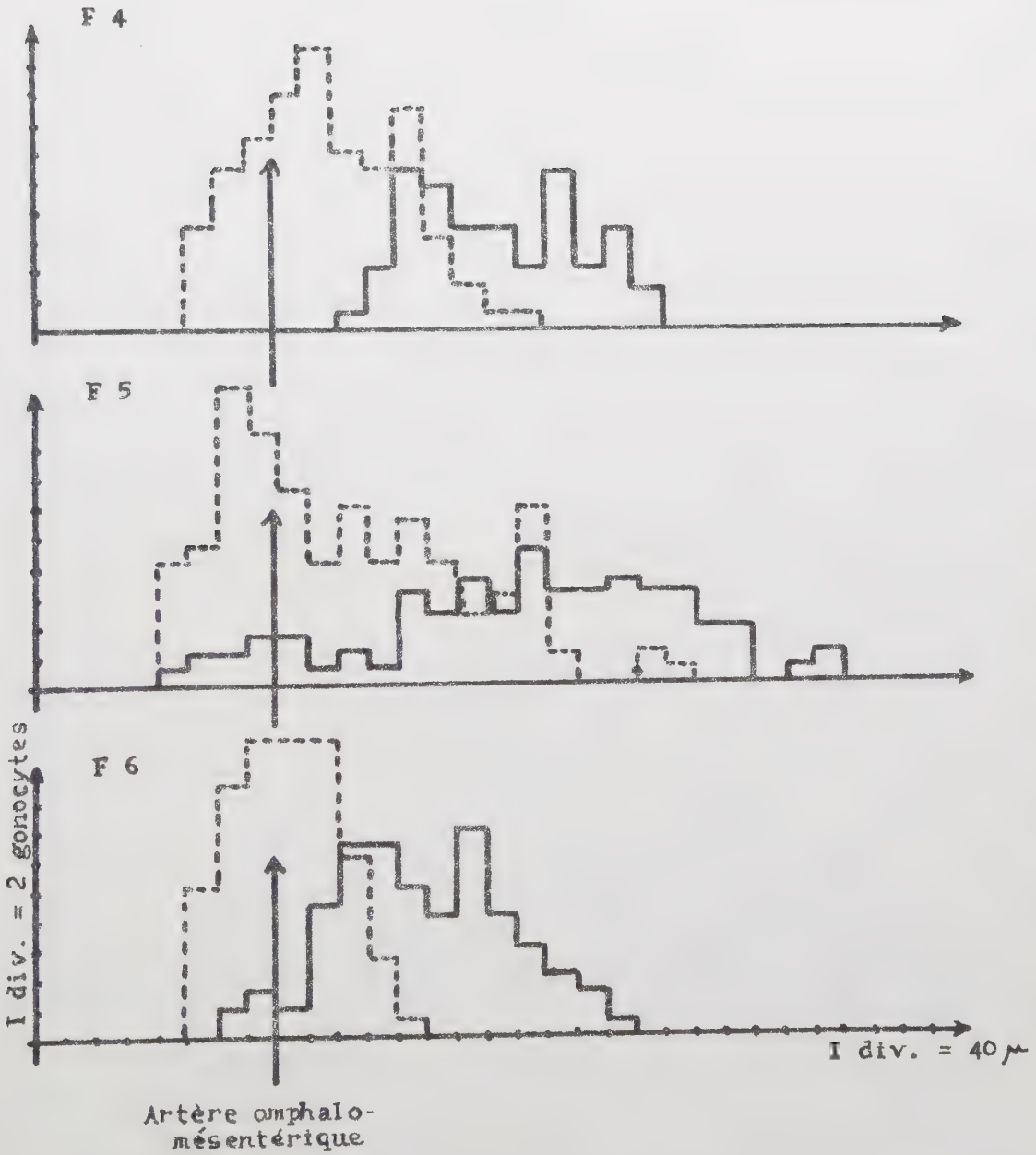
EMBRYONS femelles	Nombre total de Gonocytes	Gonocytes Extra-Gonadiques	%	Gonocytes Gonadiques	%
F 4	201	96	47	105	53
F 5	233	91	39	142	61
F 6	183	68	37	115	63
F 7	278	122	44	156	56
F 8	299	136	45	163	55
Moyenne	239	103	43	136	57

TABLEAU 2 - EMBRYONS MALES du 12e jour.

EMBRYONS mâles	Nombre total de Gonocytes	Gonocytes Extra-Gonadiques	%	Gonocytes Gonadiques	%
M 4	201	60	30	141	70
M 5	257	64	25	193	75
M 6	210	41	20	169	80
M 7	330	125	38	205	62
Moyenne	249	72	29	177	71

EMBRYONS FEMELLES

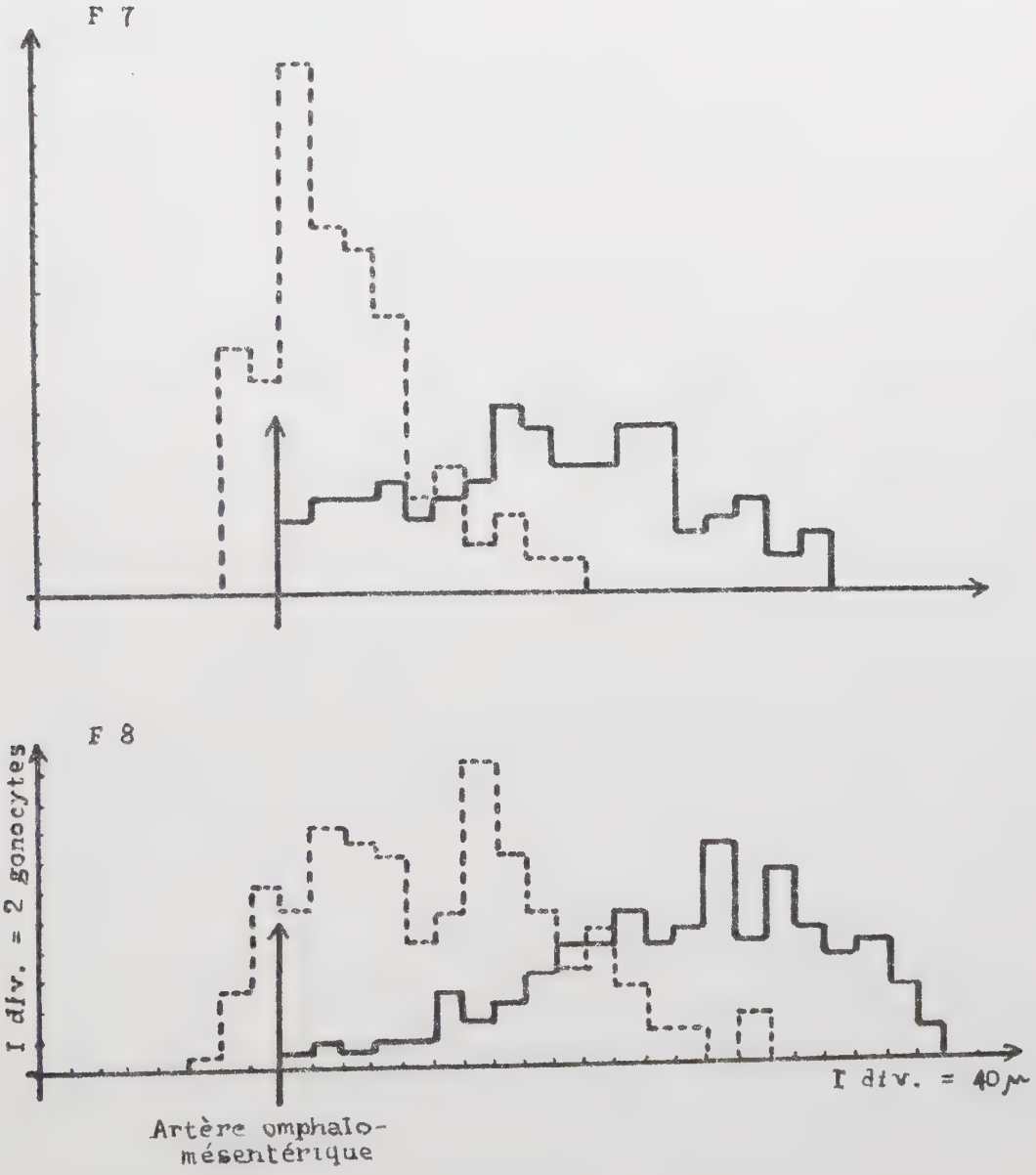
12e jour



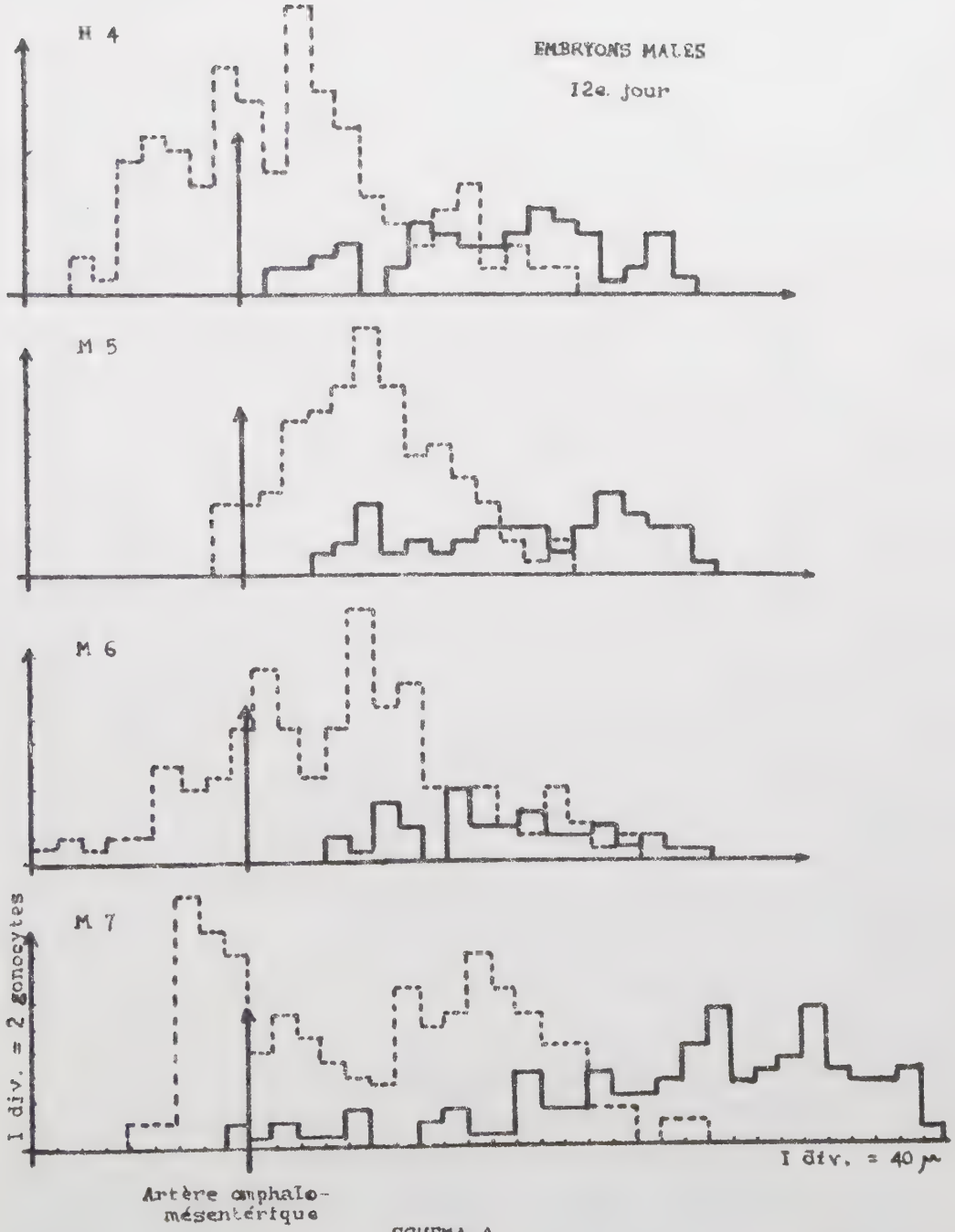
SCHEMA 3.

EMBRYONS FEMELLES

12e. jour



SCHEMA 3 bis.


M 4
EMBRYONS MALES
12e. jour
M 5
M 6
M 7
1 div. = 2 gonocytes
1 div. = 40 µ
Artère omphalo-mésentérique

SCHEMA 4.

DISCUSSION

La présence d'un corpuscule chromatinien, témoin du sexe féminin, avait déjà été signalé par OHNO et COLL.(40) à la suite de leurs travaux sur la ratte dont la formule chromosomique est XX. Selon la théorie de l'X dormant (36 - 41) cet aspect corpusculaire serait celui du chromosome X inactivé. La constatation de corpuscules chromatiniens dans les noyaux des cellules du 10e et du 12e jour est en accord avec les études antérieures qui situaient l'inactivation de l'X hétéropycnotique au 7e jour de la vie embryonnaire de la ratte.

Dans l'étude des gonocytes nous avons volontairement négligé les quelques cellules "phosphatases alcalines positives" situées en dehors de la région de migration de la majorité des cellules germinales. Elles sont presque toutes situées dans les vaisseaux et représentent 5 à 10% de l'ensemble des cellules colorées par la réaction enzymatique. Notre propos, en effet, n'est ni de discuter leur signification, ni de trancher le problème de leur appartenance à la lignée germinale, et leur petit nombre ne pourrait en aucun cas modifier les résultats de notre étude.

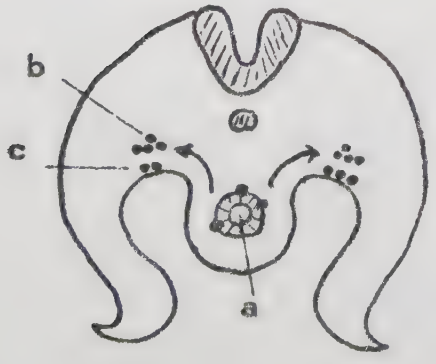
Les chiffres globaux résultant de nos comptages sont inférieurs à ceux mentionnés par CHIQUOINE. Nous pensons que des variations notables apparaissent selon la souche utilisée. D'autre part nous avons été très exigeant dans les critères d'identification : seules les cellules de grande taille présentant une réaction positive aux phosphatases alcalines au niveau de leur cytoplasme ont été considérée comme spécifiques.

Quant aux différences constatées entre le nombre des gonocytes des embryons d'un même sexe, elles tiennent probablement au décalage dans le temps de leur fécondation. En effet, à ce stade d'activité mitotique intense, le nombre des cellules germinales augmente très rapidement, il double en 24 heures. Un décalage de quelques heures peut donc se traduire par une différence notable dans le nombre des gonocytes.

L'étude des diagrammes montre qu'il n'y a pas de migration des gonocytes selon l'axe céphalo-caudal : leur position sur cet axe par rapport à la naissance de l'artère omphalo-mésentérique est la même quelque soit le sexe dans les embryons du 10e et du 12e jour (schéma 5 et 6).

La migration consiste en un étalement de la bouffée gonocytaire dans un plan transversal entre le 10e et le 12e jour.

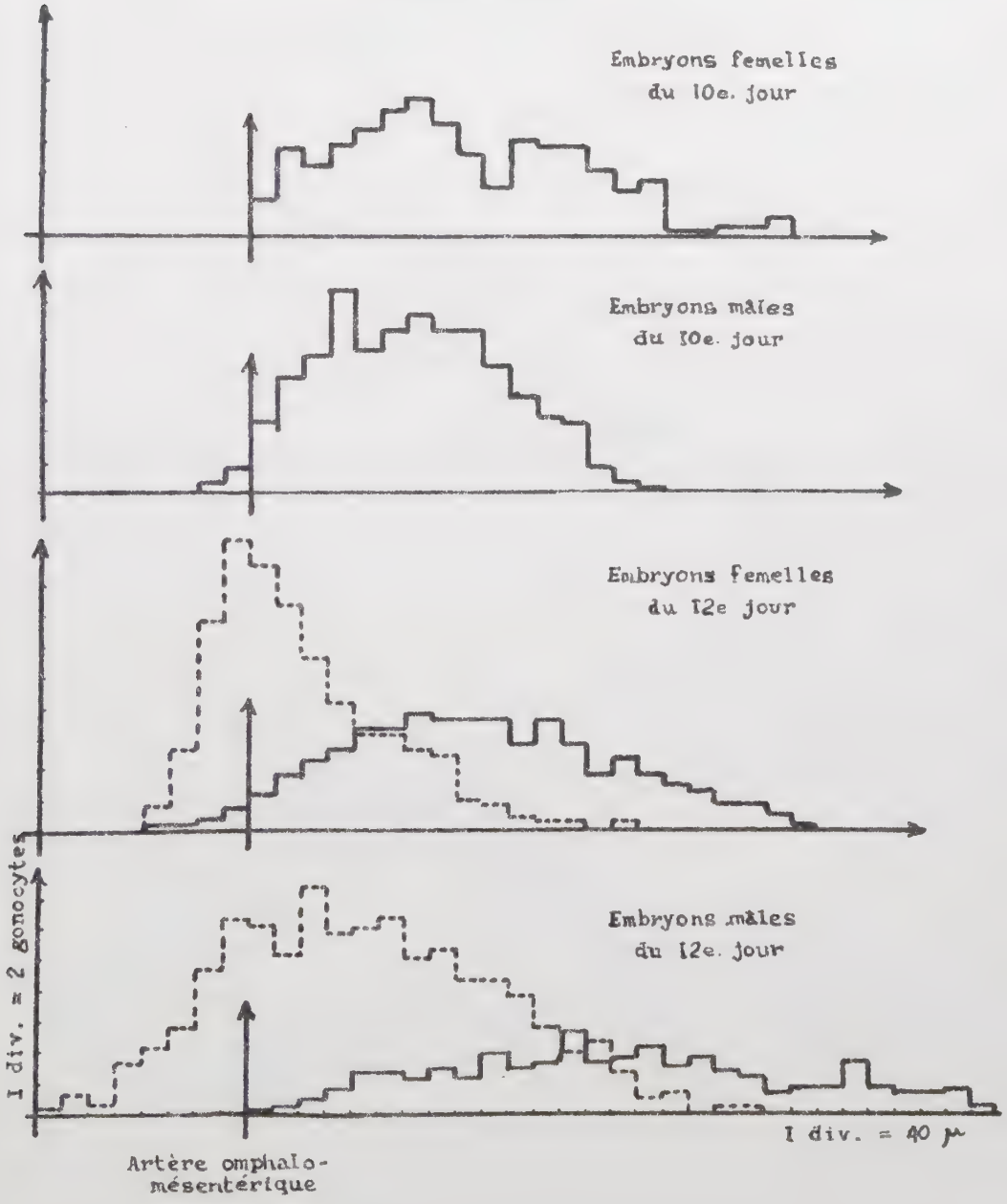
Les cellules germinales quittent la région médiane (intestin postérieur et mésentère) et gagnent la région latérale (aire gonadique) située à la même hauteur.



Coupe transversale dans la région de migration des cellules germinales

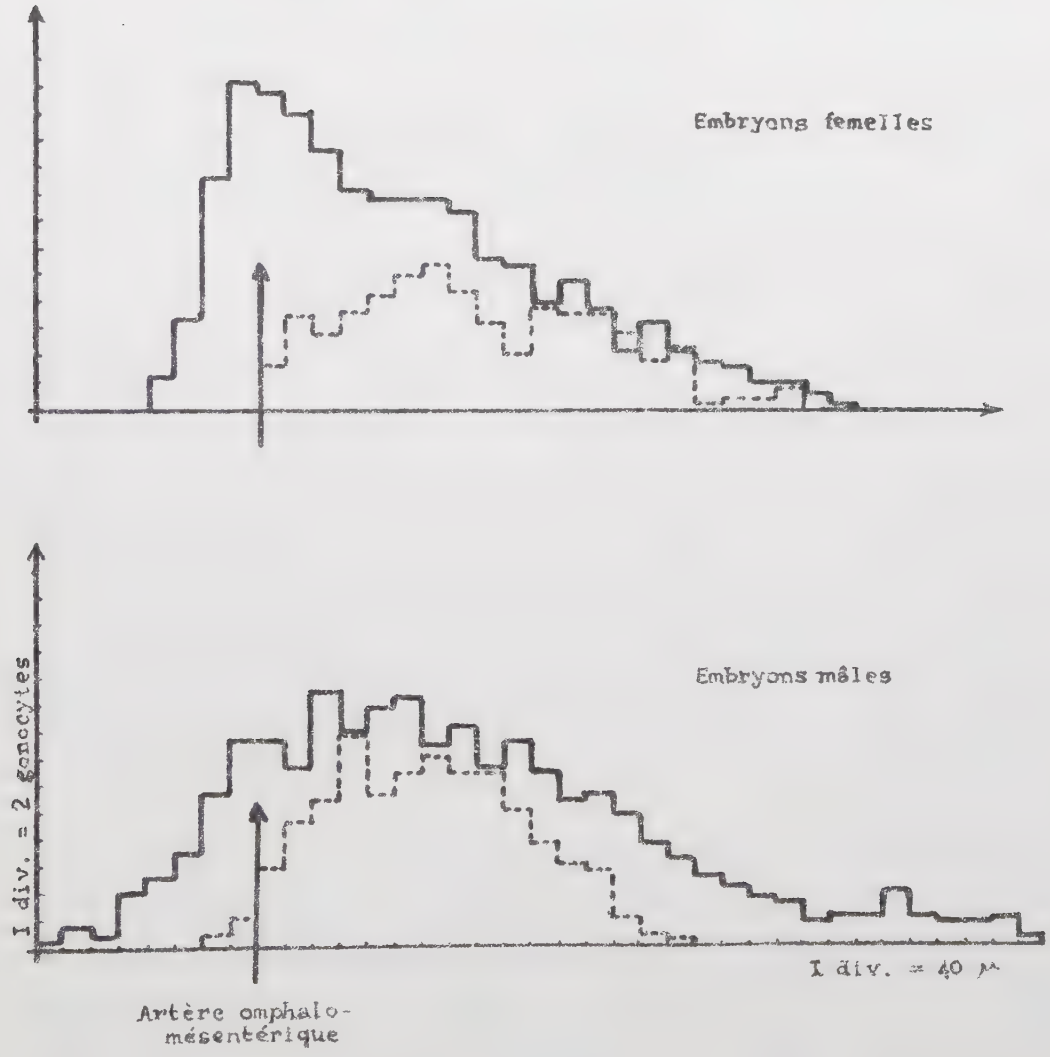
a : tube intestinal
b : aire gonadique
c : épithélium coelomique

DIAGRAMMES MOYENS.



SCHEMA 5.

DIAGRAMMES MOYENS
DES EMBRYONS DU 10e ET DU 12e JOUR



SCHEMA 6.

L'étude numérique de ce déplacement nous permet de mettre en évidence une variation selon le sexe qui apparaît au 12e jour.

A ce stade l'ébauche gonadique mâle est colonisée par 71% des gonocytes alors que l'ébauche femelle n'en a reçu que 57%. Cette proportion plus importante traduit la migration plus précoce des gonocytes vers l'ébauche gonadique dans les embryons mâles.

Cette différence sexuelle précoce dans la répartition des gonocytes précedant la différenciation gonadique fait évoquer le rôle des cellules germinales dans cette différenciation : tout se passe comme si la présence de gonocytes en nombre suffisant dans l'ébauche gonadique favorisait l'involution de l'épithélium germinatif et la formation de l'albuginée. Inversement, en l'absence d'un nombre suffisant de gonocytes dans l'ébauche au moment de la première poussée de cordons sexuels, l'épithélium germinatif continuerait de proliférer construisant une seconde poussée de cordons.

Une telle interprétation du rôle des cellules germinales au cours de la formation de la gonade nous a porté à envisager la possibilité d'une confirmation expérimentale : un retard à la colonisation d'une ébauche gonadique par les gonocytes se traduirait par des changements d'aspect et une flexion vers la féminisation des ébauches.

IIe PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

INTRODUCTION

Le choix de la méthode à employer pour modifier cette "étape gonocytaire" de la différenciation sexuelle nous a été inspirée par les travaux de SALZGEBER sur l'embryon de poulet (43). Une solution acqueuse d'ypérite azotée déposée dans le milieu où sont maintenus in vitro des embryons mâles de 3 à 4 jours et demi entraine dans 15 cas sur 28 la formation d'ovo-testis (pour la gonade gauche). Cette féminisation du testicule est plus ou moins nette mais reste localisée dans tous les cas à une zone limitée de la gonade, les autres territoires présentant un aspect testiculaire normal. L'assymétrie de l'atteinte testiculaire n'est pas expliquée par l'auteur mais on sait que chez l'oiseau il existe, normalement une assymétrie gonadique. La grande sensibilité des gonocytes à la drogue, soulignée par l'auteur, fait suspecter leur rôle particulier dans ce trouble expérimental de la différenciation sexuelle.

L'action du cyclophosphamide (Endoxan*) sur les cellules germinales des mammifères a déjà été l'objet de nombreuses études expérimentales. Celles de GERLINGER et CLAVERT concernant le lapin : l'injection de cyclophosphamide à des lapines gestantes entraîne chez les embryons "une diminution du nombre des gonocytes en fonction de la dose injectée" et, "à dose égale, la plus grande sensibilité des gonades femelles par rapport aux mâles" (23). En effet, à doses égales, les cellules germinales ont toutes disparu dans les ovaires alors qu'elles persistent en nombre réduit dans les testicules.

* Laboratoire LUCIEN

La période de sensibilité maximale à la drogue coïncide avec le moment de la migration des cellules germinales (24).

Les doses nécessaires pour obtenir ces effets étaient des doses élevées provoquant de nombreuses malformations associées : hypotrophie, brachymélie, hypognatie associée le plus souvent à une fente palatine (25) mais aucune anomalie gonadique autre que leur deshabitation par les cellules germinales n'a été notée.

Les conclusions de TAMBOISE (49) quant aux malformations induites chez le rat sont identiques. Il précise en outre la D. L. 50 pour les embryons : 1 mg pour 100 grammes par voie intra-musculaire au 8e jour, mais ne mentionne pas les modifications gonadiques secondaires à l'action de la drogue.

A partir de ces données nous avons étudié l'effet sur la formation des gonades embryonnaires d'injections de cyclophosphamide faites à des rattes gestantes au stade correspondant à la migration des cellules germinales des embryons. Nous avons essayé d'employer des doses inférieures à celles pour lesquelles l'effet tératogène est important en espérant obtenir une action sélective sur les cellules germinales très sensibles à la drogue.

MATERIEL ET METHODE

Comme précédemment, le premier jour de la gestation a été établi par l'étude des frottis vaginaux (présence de spermatozoïdes). Les rattes gestantes sont numérotées en fonction de la dose reçue et du jour de l'injection comme l'indique le tableau ci-dessous :

Jour de l'injection	Doses en microgrammes pour 100 gr.				
	10	20	100	200	300
7e jour	A I	A II	A III	A IV	A V
8e jour	B I	B II	B III	B IV	B V
9e jour	C I	C II	C III	C IV	C V
7e et 8e jour	D I	D II	D III	D IV	D V
8e et 9e jour	E I	E II	E III	D IV	D V

Les embryons ont été sacrifiés au 20e jour de la gestation. Nous avons noté le poids et la distance ano-génitale et examiné la morphologie externe de chaque embryon. Les gonades ont été ensuite prélevées, fixées, puis coupées en série (7 microns). Les coupes sont colorées en partie par la mise en évidence de la réticuline (d'après WILDER) en partie au P. A. S. selon la méthode de Mac Manus (LISON 35).

Nous avons examiné les gonades des témoins afin d'apprécier le degré normal de différenciation des testicules et des ovaires à ce stade.

Le testicule est bien limité par une albuginée épaisse, dense, riche en matériel P. A. S. positif.

L'épithélium germinatif est réduit au minimun ou absent.

Le mésenchyme est très réduit, l'ensemble de la glande étant occupé par les tubes séminifères tassés les uns contre les autres.

Ces tubes sont bien développés avec des cellules de Sertoli nombreuses, régulièrement disposées à la périphérie, reconnaissable à leur noyau triangulaire et à leur taille assez petite. Les cellules germinales apparaissent dans la lumière des tubes sous la forme de spermatogonies et de spermatocytes. Les divisions cellulaires sont nombreuses.

Entre les tubes, au sein des rares éléments mésenchymateux on observe des cellules intersticielles et de nombreux capillaires. (photo 5 et 6)

L'ovaire présente une structure moins différenciée : le cortex est encore jeune, sans transition nette avec l'épithélium germinatif périphérique. Les cellules germinales sont bien distinctes du fait de leur grande taille et de leur cytoplasme clair d'aspect vacuolaire.

Il n'y a pas de follicules bien individualisés mais certains groupements cellulaires autour des cellules germinales évoquent leur formation imminente (photo 7 et 8).

Testicule normal

(Embryon de rat du 20e jour)

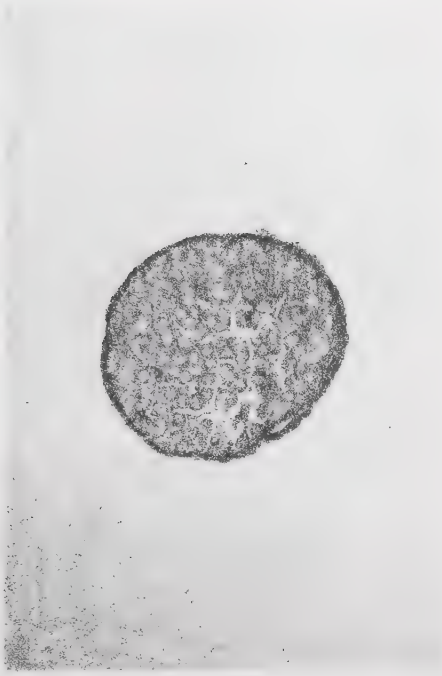


Photo 5 : Aspect au faible grossissement

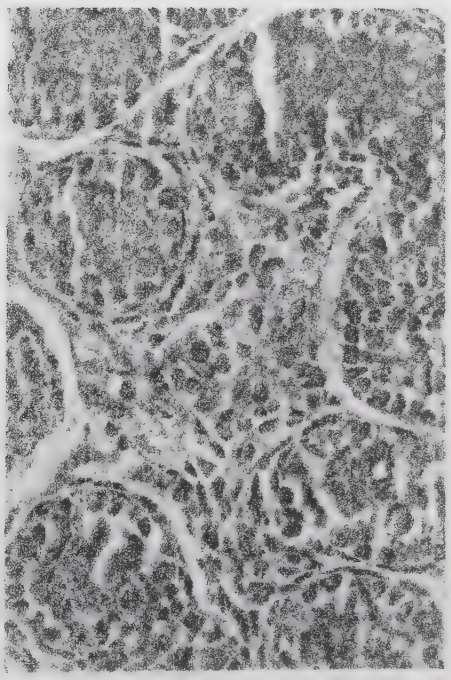
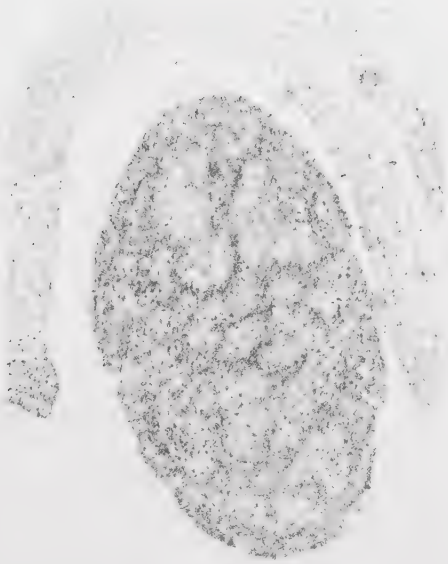


Photo 6

Tubes séminifères et espace intertubaire (fort grossissement)



Ovaire normal

(Embryon de rat du 20e jour)

Photo 7 : Aspect au faible grossissement

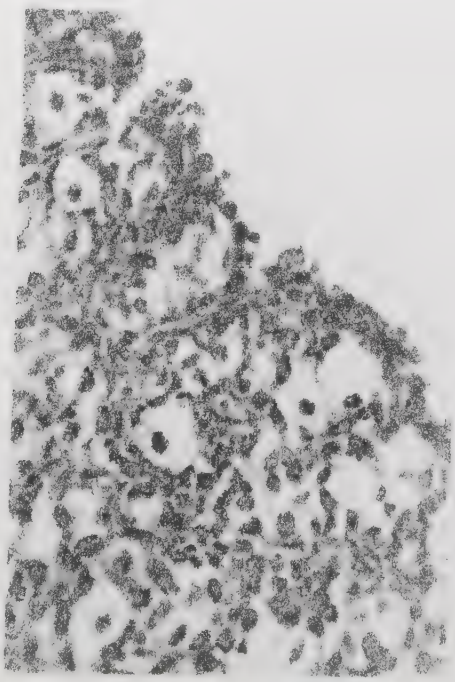


Photo 8

Cortex ovarien, ovocytes et formation des follicules (fort grossissement)

Nous avons étudié les gonades embryonnaires après effet de la drogue et comparé leur aspect avec celui des témoins. En particulier, nous avons recherché non seulement les altérations de la lignée germinale mais aussi les modifications des autres éléments (sertoliens, intersticiels et mésenchymateux).

RESULTATS

1 - Les embryons dont les mères ont reçu une dose de cyclophosphamide égale ou inférieure à 100 microgrammes pour 100 grammes, quel que soit le jour de l'injection, ont tous un aspect comparable à celui des témoins.

Leur taille est identique quel que soit le sexe, leur poids variant de 3,5 à 4 grammes.

La distance ano-génitale est en moyenne de 3,1 mm pour les mâles contre 2,2 mm pour les femelles.

Nous n'avons observé aucune anomalie morphologique externe ou interne, en particulier les gonades ont un aspect normal.

Ces résultats concernent les portées A1, B1, C1, D1, E1, AII, BII, CII, DII, EII, AIII, BIII, CIII.

2 - Pour la dose de 200 microgrammes pour 100 gr. le poids et la morphologie des embryons sont encore normales mais nous avons observé des modifications de l'aspect du testicule. (photo 9 et 10)

Les tubes séminifères sont moins nombreux et hypotrophiques. Leurs éléments sertoliens semblent peu modifiés, par contre, nous constatons une nette diminution du nombre des mitoses des cellules germinales.

Les espaces intertubaires se développent de telle sorte que l'ensemble du testicule garde un volume total comparable à celui des témoins. En effet,

le mésenchyme est hypertrophié et compense, à lui seul, les vides laissés par les tubes manquants ou hypotrophiques.

Les cellules intersticielles sont en nombre normal et gardent une topographie en amas et en cordons qui nous permet de situer l'emplacement des tubes manquants.

Dans certains cas nous avons remarqué la présence, dans l'interstitium, de cellules de grande taille à cytoplasme clair nettement distinctes des cellules intersticielles (photo 11).

Il faut souligner que les modifications n'apparaissent pas de façon uniforme. Nous les avons observé dans certaines zones testiculaires seulement, tandis que le reste de la glande conserve un aspect normal. De plus, dans certains embryons, l'un des testicules ou parfois les deux semblent échapper aux effets du cyclophosphamide pour cette dose de 200 microgrammes pour 100 grammes.

Pour être efficace le cyclophosphamide doit être administré au 7e jour ou au 8e jour ou encore être réparti entre ces deux stades (rattes AIV - BIV et DIII).

Les injections faites le 9e jour (CIV) ou réparties entre le 8e et le 9e jour (EIII) n'induisent, à dose égale aucun remaniement des gonades embryonnaires.

Pour les doses employées, nous n'avons observé aucun changement évident de l'aspect histologique de l'ovaire quel que soit le jour de l'injection.

Testicule modifié
après action du cyclophosphamide

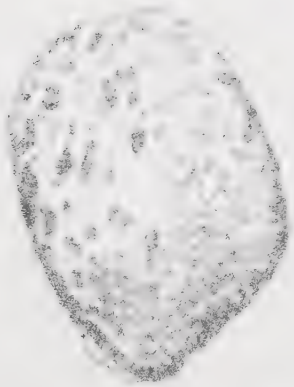
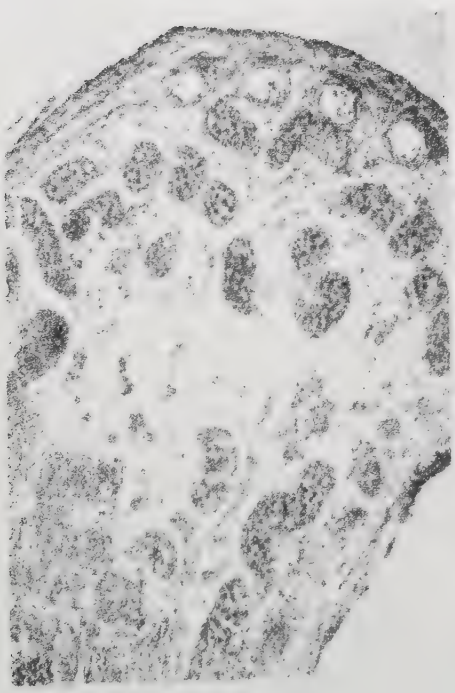
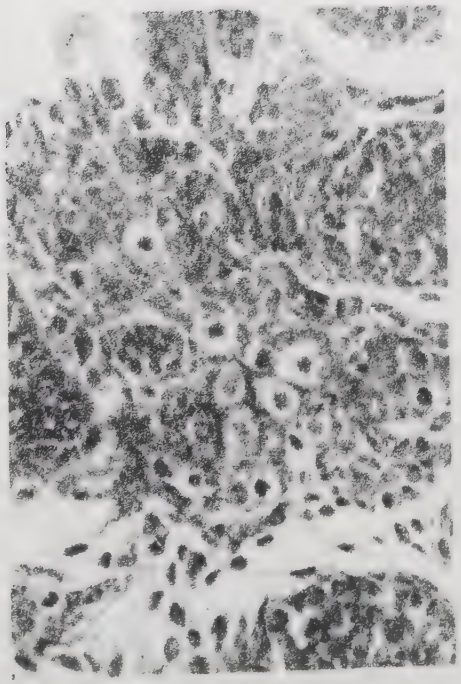


Photo 9 : faible grossissement

Photo 10 : espaces intertubaires remaniés

Photo 11 :
cellules claires observées au sein de l'interstitium





3 - Pour une dose de 500 microgrammes pour 100 gr l'effet tératogène se traduit non seulement par des modifications gonadiques mais aussi par des anomalies somatiques.

Tous les embryons de la portée AV (ratte injectée au 7e jour) sont vivants mais leur poids est nettement inférieur (2,8 grammes en moyenne) à celui que nous avons constaté habituellement au 20e jour de la gestation (3,5 à 4 grammes).

Les gonades des embryons mâles présentent les anomalies des tubes séminifères et la réaction interstitielle déjà obtenue pour une dose de 200 microgrammes pour 100 grammes. Mais, en plus, nous constatons cette fois une diminution du nombre des cellules interstitielles dans la zone remaniée.

Dans la portée BV (ratte injectée au 8e jour) quatre embryons sur sept sont en voie de résorption.

L'mebryon femelle restant présente une morphologie normale et ses gonades ont un aspect comparable à celui des témoins.

Des deux embryons mâles, l'un est porteur de malformations importantes (éventration, anencéphalie et micrognatie) et d'une franche assymétrie gonadique aux dépens du testicule droit.

Les gonades de ces deux embryons présentent, comme précédemment, une nette diminution de la quanti-

té et du volume des tubes séminifères compensée par une prolifération mésenchymateuse. Par contre nous n'avons pas retrouvé dans l'interstitium les grandes cellules claires observées dans les gonades de certains embryons de la portée AIV.

DISCUSSION

L'injection de cyclophosphamide à des rattes gestantes nous permet d'obtenir des modifications des gonades embryonnaires.

Pour une dose de 200 microgrammes l'effet de la drogue se traduit seulement par une diminution du nombre et de la taille des tubes séminifères. Cette hypotrophie est dûe à l'atteinte des cellules germinales puisqu'aucune autre lignée cellulaire ne paraît altérée. Nous pensons qu'à cette dose l'action du cyclophosphamide sur les gonades est secondaire à son effet cytotoxique sur la lignée germinale.

Nous observons une hypertrophie compensatrice des éléments mésenchymateux ; elle souligne, à notre sens, l'équilibre qui existe normalement entre le mésenchyme et la lignée germinale dans la morphogénèse de la gonade.

Aucune cellule de Sertoli n'est observée en dehors des tubes même lorsque ceux-ci sont franchement moins nombreux. Tout se passe comme si la présence des cellules germinales conditionne le maintien des tubes et le développement des éléments sertoliens.

Le tissu intersticiel, par contre, semble indépendant puisque nous n'observons aucune modification de son aspect et même de sa topographie pour cette dose de cyclophosphamide dont l'action peut être considérée sélective sur la lignée germinale.

Pour une dose de 500 microgrammes pour 100 gr. l'effet de la drogue n'est plus limité aux cellules germinales puisque l'on observe, selon le jour de l'injection, une diminution générale des poids des embryons ou un effet tératogène encore plus important (résorptions, malformations).

La diminution du nombre des cellules interstitielles observée dans ces conditions souligne leur indépendance par rapport à la lignée germinale. Notons par contre, qu'aucun des tubes séminifères conservés n'est dépourvu de cellules de Sertoli. Là encore les éléments sertoliens semblent étroitement liés aux cellules germinales.

Nous constatons que le maximum d'efficacité du cyclophosphamide sur les gonades, pour une dose donnée, se situe au 7e - 8e jour de la gestation comme cela avait déjà été observé dans l'étude des malformations induites par cette drogue. Il s'agit là d'un stade précédant celui de la migration des cellules germinales mais ce décalage peut être expliqué par un temps de latence entre l'injection et son effet sur les embryons.

Nous retiendrons essentiellement la deshabitation de la gonade par les cellules germinales car ce critère est en faveur d'un envahissement gonocytaire moins important de l'ébauche gonadique, ce que nous cherchions à obtenir par notre expérimentation.

Les modifications observées n'apparaîssent que dans une zone limitée de la gonade qui s'étend du centre

vers la périphérie en forme de quadrant et respecte, le plus souvent, les tubes séminifères situés contre l'albuginée. Cette topographie pourrait correspondre à un territoire plus exposé pour des raisons vasculaires ou nerveuses dont l'importance au cours de la spermatogénèse a déjà été soulignée (COUJARD 14).

Contrairement aux observations faites sur la lapine par GERLINGER et CLAVERT nous constatons l'action plus importante du cyclophosphamide sur les gonades mâles que sur les gonades femelles.

Nous pensons qu'il ne faut pas, pour l'expliquer, simplement évcquer la plus grande sensibilité au cyclophosphamide des gonocytes mâles mais aussi envisager le rôle des cellules germinales dans la morphogénèse de la gonade. Elles semblent en effet, d'après les résultats de notre expérimentation, conditionner le développement des cellules de Sertoli et la trophicité des tubes séminifères ; surtout elles équilibrent la prolifération du mésenchyme.

Les modifications observées témoignent d'un retard à la différenciation et le contraste avec l'aspect normal apparaît nettement dans les embryons mâles parce que l'organogénèse de ses gonades est habituellement plus avancée que celle des embryons femelles au même stade (20e jour).

Il nous reste à discuter la signification des grandes cellules claires, d'aspect vacuolaire, dont nous avons remarqué la présence dans certaines zones de l'interstitium. Il pourrait s'agir d'une forme de dégé-

nérescence des cellules intersticielles mais leur ressemblance avec certaines cellules germinales fait évoquer leur appartenance à cette lignée. Seule une étude cytologique approfondie donnerait une certitude et permettrait d'avancer qu'il s'agit là de cordons sexuels témoignant d'un retard encore plus important de la différenciation.

CONCLUSIONS

L'étude d'embryons de rat au 10e et au 12e jour de la gestation nous a permis de mettre en évidence :

1 - Qu'à ce stade d'indifférenciation gonadique le sexe des embryons peut être déterminé par l'étude de la chromatine sexuelle : 90% des cellules des embryons femelles possèdent un corpuscule chromatinien.

2 - Que la position de tous les embryons dans la corne utérine est identique à un stade donné de la gestation. Cette observation nous permet de proposer une représentation schématique de la répartition des cellules germinales en tenant compte de leur nombre et de leur topographie.

3 - Que la migration des gonocytes entre le 10e et le 12e jour de la gestation consiste en un étalement dans un plan transversal sans déplacement selon l'axe céphalo-caudal de l'embryon.

4 - Que la répartition des cellules germinales varie selon le sexe ; la colonisation de l'ébauche gonadique intervient plus précocement dans les embryons mâles et se traduit au 12e jour de la gestation par un envahissement gonocytaire plus important de l'ébauche que dans les embryons femelles.

L'étude des effets d'injections de cyclophosphamide à des rattes gestantes sur les gonades embryonnaires autorise les conclusions suivantes:

1 - La sensibilité des gonocytes à la drogue est telle qu'une action sélective sur la lignée germinale est possible avec une dose faible : 200 microgrammes

pour 100 grammes. (A partir de 500 microgrammes l'effet tératogène n'est plus spécifique).

2 - C'est au niveau des gonades mâles, normalement différenciées à un stade plus précoce que les gonades femelles, qu'apparaissent des anomalies.

3 - L'effet du cyclophosphamide se traduit par le remaniement d'un territoire limité des testicules atteints, aux dépens des tubes séminifères et au profit des éléments mésenchymateux ; ceci évoque un retard de différenciation secondaire à l'altération des cellules germinales.

Ces observations soulignent l'importance du facteur gonocytaire au cours de l'organogénèse de la gonade mâle et permettent d'envisager l'existence d'une véritable "étape gonocytaire" dans la différenciation sexuelle.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ABOIM 1945 Rev. Suisse Zool. 52

2 - ALLEN B. M. 1907 , An important period in the history of the sex-cells of Rana pipiens
Anat. Anz. 31 339 - 347

3 - ALLEN B. M. 1911 , The origin of the sex-cells of Amia and Lepidosteus
J. Morph. 22 1 - 36

4 - ANCEL P. et BOUIN P. 1926 , Recherches expérimentales sur l'origine des gonocytes dans le testicule des mammifères
C. R. Ass. Anat. 21 3 - 11

5 - BALBIANI E. G. 1885 , Contribution à l'étude de la formation des organes sexuels chez les insectes
Recueil Zoologique Suisse
2 527 - 588

6 - BENOIT J. 1930 , Destruction des gonocytes primaires dans le blastoderme du poulet par les rayons ultra-violets, aux premiers stades du développement embryonnaire
Proc. 2nd Int. Congr. for Sex Res.
162 - 170

7 - BOUNOURE L. 1937 , La constitution des glandes génitales chez la grenouille rousse après destruction étendue de la lignée germinale par l'action des rayons ultra-violets sur le pôle inférieur de l'oeuf
C. R. Acad. Sc. 204 1837 - 1839

8 - BOUNOURE L. 1939 , L'origine des cellules reproductrices et le problème de la lignée germinale
Gauthiers - Villars PARIS

9 - BOVERI Th. 1887 , Uber differenzierung der Zellkerne während der furchung der Eies von Ascaris megalocephala
Anat. Anz. 2 688 - 693

10 - BRACHET A. 1935 , Traité d'Embryologie des Vertébrés
Masson et Cie PARIS

11 - BRAMBELL F. W. R. 1927 , The development and morphology of the gonads of the mouse
Proc. Roy. Soc. B 101 391 - 409

12 - CHIQUOINE A. D. 1954 , The identification, origin, and migration of the primordial germ-cells in the mouse embryo
Anat. Rec. 118 135 - 146

13 - CORDIER G. et COUJARD R. 1939 , Description d'un embryon humain de 0,90 mm. Etude histologique de cet embryon et d'un embryon humain de 1,05mm précédemment décrit
Ann. Anat. Path. et Anat. normale médico-chirurgicale 16/4

14 - COUJARD R. 1958 , Le facteur nerveux périphérique ses incidents sur la spermatogénèse dans la fonction spermatogénétique du testicule humain
Masson PARIS p. 91 - 105

15 - DA COSTA A. C. 1948 , Elements d'Embryologie
2e Ed. Masson et Cie PARIS

16 - DANTSCHAKOFF W. 1934 , Les bases de la sexualité Continuité de la lignée germinale
Alcan PARIS

17 - DEBEYRE A. et CHRISTIN M. 1936 , De la migration des gonocytes primaires chez l'embryon humain de 31 - 32 somites
C. R. Ass. Anat. 1936 p. 145

18 - DUSTIN A. P. 1908 , Recherche sur l'origine des gonocytes chez les Amphibiens
Arch. Biol. PARIS 23 411 - 522

19 - EVRETT N. B. 1943 , J. Exp. Zool. 92 49

20 - EVRETT N. B. 1945 , The present status of the germ-cell problem in vertebrates
Biological Rev. 20 45 - 55

21 - FIRKET J. 1914 , Recherches sur l'organogénèse des glandes sexuelles chez les oiseaux
Arch. Biol. 29 201 - 351

22 - FIRKET J. 1920 , Arch. Biol. 30 393 - 516

23 - GERLINGER P. et CLAVERT J. 1964 , Action du cyclophosphamide injecté à des lapines gestantes sur les gonades embryonnaires
C. R. Acad. Sc. 258 2899 - 2901

24 - GERLINGER P. et CLAVERT J. 1964 , Action du cyclophosphamide injecté à différentes périodes de la gestation sur les cellules sexuelles embryonnaires de lapin
C. R. Soc. Biol. 158/12
2464 - 2466

25 - GERLINGER P. et CLAVERT J. 1965 , Anomalies observées chez des lapins issus de mères traitées au cyclophosphamide
C. R. Soc. Biol. 159/ 6
1462 - 1466

26 - GOMORI R. 1946 , The study of enzyme in tissue section
Am. J. Clin. Path. 16 347

27 - HAECKER V. 1897 , Die Keimbahn von cyclops-Neue Beiträge zur- kenntniss der Geschlechtszellen-Sendenng
Arch. mikros. Anat. 49 35 - 91

28 - HARGITT G. T. 1926 , The formation of sex-glands and germ-cells of Mammals. The history of the male germ-cells in Albino-Rat
Journ. of Morphol. 42 253 - 294

29 - HENNEGUY 1893 , Le corps vitellin de Balbiani dans l'oeuf des Vertébrés
Journ. Anat. Physiol. 29 1 - 39

30 - HEYS Florence 1931 , The problem of the origin of germ-cells
Quart. Rev. Biol. 6 1 - 45
Laboratoire d'Evolution Bd. Raspail

31 - HUMPHREY R. R. 1927 , Extirpation of the primordial germ-cells of Amblyostoma ; its effects upon the development of the gonad
Jour. Exp. Zool. 49 363 -389

32 - JOST A. et PEPIN J. 1966 , Données sur la migration des cellules primordiales du foetus de veau
Arch. Anat. Micr. 55/2 161 - 186

33 - KINGERY H. M. 1917 , Oogenesis in the White mouse
J. Morph. 30 261 - 315

34 - LIMBORGH J. Van 1961 , La répartition numérique des cellules germinales sur les ébauches gonadiques. Un critérium précoce du sexe génétique chez l'embryon de canard
Arch. Anat. Micro. et Morph. Exp.
50/ 4 p. 469 - 486

35 - LISON L. 1960 , Histochimie et Cytochimie animales Principes et méthodes
3ème Edition Gauthier- Villars Edit. PARIS

36 - LYON M. F. 1961 , Gene action in the X - Chromosom of the mouse
Nature 190 372 - 373

37 - Mc KAY D. 1953 , Histochemical observations on the germ-cells of human embryos
Anat. Rec. 117 201 - 219

38 - MINTZ B. et RUSSEL E. S. 1957 , Gene-induced embryological modifications of primordial germ-cells in the mouse
J. Exp. Zool. 134 207 - 238

39 - MINTZ B. 1960 , Embryological phases of mamalian gametogenesis
J. Cell. Comp. Physiol.
56 (supp 1) 31 -47

40 - OHNO S. KAPLAN W. D. KINOSITA R. 1959 , Formation of the sex chromatin by a single X chromosome in liver cells of rattus norvegicus
Exp. Cell. Res. 18 415

41 - OHNO S. et MAKINO S. 1961 , The single X nature of sex chromatine in man
Lancet I. 78 - 79

42 - OKKELBERG P. 1921 , The early history of the germ-cells in the brook lamprey. Entosphenus Wilden (Gage) up to and including the period of sex differenciation
J. Morph. Physiol. 35 1 - 151

43 - SALZGEBER B. 1963 , Action féminisante de l'ypérite azotée sur le testicule d'embryon de poulet
C. R. Acad. Sc. 257 754

44 - SIMKINS C. S. 1923 , On the origin and the migration of the so-called primordial germ-cells in mouse and rat
Acta. Zool. 4 241 - 278

45 - SIMKINS C. S. 1928 , Origin of the sex cells in man
Amer. J. Anat. 41 249 - 272

46 - SIMON D. 1957 , La migration des cellules germinales de l'embryon de poulet vers les ébauches gonadiques
C. R. Soc. Biol. 151 1576 - 1580

47 - SNELL G. D. 1956 , dans Biology of the Laboratory mouse Chap. 1
Dover Publications Inc. New York

48 - SWIFT C. H. 1914 , Origin and early history of the primordial germ-cells in the chick
Am. J. Anat. 15 483 - 516

49 - TAMBOISE E. et TAMBOISE A. 1965 , A propos de l'action simultanée d'une moutarde à l'azote (cyclophosphamide) sur la structure des chromosomes et le développement chez l'embryon de rat
C. R. Ass. Anat. 129 1661 - 1672

50 - WALDEYER W. 1870 , Eierstock und Ei. Leipzig

51 - WHEELER 1900 , The development of the urogenital organs of the Lamprey
Zool. Jahrb. Abth. Anat. Ontog
13 1 - 88

52 - WILLIER B. H. 1950 , Sterile gonads and the problem of the origin of the germ-cells in the chick embryo
Arch. Anat. Micr. et Morph. Exp.
39 269

53 - WITSCHI E. 1948 , Migration of the germ-cells of human embryos from the yolk-sac to the primitive gonadal folds
Carnegie Inst. Washington
Contribut. to Embryol. 32 67 - 80

Vu, le Professeur
R. COUJARD

Vu , le Doyen
Pour le Doyen,
l'Assesseur :
D. BARGETON

Vu et
Permis d'imprimer,
Le Recteur :
J. ROCHE